第39卷第1期
1996年2月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 39, No.1
Feb., 1996

细菌冰核提高印度谷螟过冷却点的研究*

冯玉香 何维勋

(中国农业科学院农业气象研究所 北京 100081)

摘要 印度谷螟(*Plodia interpunctella*)是一种不耐结冰的昆虫，在冬季它通过降低过冷却点以避免结冰。现已查明，冰核活性细菌能显著提高植物的过冷却点，导致许多作物在较高的温度下发生霜冻害。本文也证明细菌冰核能显著提高印度谷螟幼虫的过冷却点。对照的平均过冷却点是 －17.6℃；分别用0.1g和1g细菌冰核与1kg面粉混合后进行处理，平均过冷却点分别比对照提高了12.8℃和13.6℃。研究结果支持这样的观点：细菌冰核有可能成为一种在冬季使用的、杀灭不耐结冰害虫的生物制剂。

关键词 细菌冰核，过冷却点

在我国北亚热带以北的广大地区，冬季最低气温都达到 －5℃以下，是一种可能使越冬害虫发生体液结冰的自然条件。许多昆虫是不耐结冰的，组织内有冰晶形成，虫体就不能存活。为了避免在冬季受冻死亡，它们采取的主要策略是降低自身的过冷却点[1]。过冷却点是用温度表示的。虫体温度降到冰点以下时，体液并不马上结冰，仍然保持液态，即过冷却状态。温度继续下降，到某一程度时，体液中开始生长冰晶，对细胞和组织造成致命损伤。冰晶开始生长的临界温度称为过冷却点。所以过冷却点代表这类昆虫能忍耐的极限低温，是衡量抗寒力的一个尺度[2]。这类害虫越冬后仍然存活的一个主要原因是它们的过冷却点很低。影响过冷却点高低的因素虽然很多，但起主要作用的是虫体上冰核的数量和活性。害虫在准备越冬时期，能够把体内的冰核排出或使之失去活性以降低其过冷却点[3]。

近代研究发现，自然界存在冰核活性(ice nucleation active)细菌(简称INA细菌)[4]。对我国10个省、市、自治区45种植物上的细菌进行鉴定，证明各地各种植物上广泛存在INA细菌[5]，它能够使20μl小水滴的过冷却点由 －10.7℃提高到 －2.8℃，使黄瓜幼苗的过冷却点由 －6.1℃提高到 －2.0℃。它们是诱发不耐结冰的农作物在零度以下比较高的温度发生霜冻的主要原因[6]。除去INA细菌或使之失去冰核活性是防御霜冻的一条新途径[7]。由此推论，如果给不耐结冰的越冬害虫加上INA细菌，也可能提高其过冷却点，使之在零度以下较高的温度发生结冰，造成死亡。这个推论可望为控制害虫提供一条新的途径，开始引起人们的注意[8~10]。

1 材料和方法

以印度谷螟(*Plodia interpunctella*)幼虫为供试材料，于北京12月(从粮仓采集)，经14℃左右驯化4周后从中选出长(6±0.4)mm的幼虫，鉴定其耐结冰性，测定过冷

* 国家自然科学基金资助项目
1994－03－05收稿，1994－09－19收修改稿

却点和细菌冰核对过冷却点的影响。

INA细菌的成冰作用并不是细菌本身，而是细菌产生的、聚集在细胞外壁上的活性蛋白，大小在150KDa到19 000KDa之间，在小冰晶形成中象模板一样起冰核作用，使水分子在它的周围结成冰晶。直接应用INA细菌会有污染，所以在冰蛋白形成后，用特定杀菌剂杀死细菌而保存冰核蛋白，经浓缩、冻干而制成细菌冰核制剂。本试验用的是美国AGS公司生产的商品名为Snomax的细菌冰核，使用前以Vati小滴冻结法[11]测定，其核谱如(图1)。表明有活性的冰核数，在 -2.7 ℃时就有 5×10^2 个/g，-3.0 ℃时增加到 10^5 个/g，-5.0 ℃时高达 10^7 个/g。

印度谷螟幼虫放入聚丙烯小管内，虫体上安放MF51型温度传感器，再悬挂在玻璃管内，加橡皮塞固定，把玻璃管放入半导体致冷的磷酸盐型不冻液中。温度传感器与AML 1 000型数据采集器和AM286微型计算机相连，可连续自动测量并记录虫体温度，同时绘出温度变化曲线，精度 ±0.2 ℃。由控温系统操纵，使虫体温度按0.6 ℃/10min的速率下降。当体液开始结冰时，由于潜热释放，体温会突然升高，随后又逐渐下降。从体温变化曲线上很容易判断虫体是否发生结冰，发生结冰的可读出过冷却点。本试验设备共有16个通道，一次试验就可以分别记录并绘出16头幼虫的体温变化曲线。

2 试验结果

2.1 忍耐结冰的能力

按照上述试验方法用80头幼虫进行耐结冰性鉴定。控制虫体温度降到 -15 ℃，持续30 min，然后慢慢升温，至10 ℃后从管中取出虫体，在室温下观察。刚取出时虫体都僵直不动，过一段时间后，有的恢复爬行，表明是活的，有的则一直不活动，逐渐变黑，显然已经死亡。从每一头幼虫的体温变化曲线上可以看出，有的曾出现温度突然升高，即发生了冻结；有的则未发生冻结，仍然保持过冷却状态。对比分析看出，有7头幼虫发生了冻结，而且持续时间在20 min以上，结果都死亡。其余的73头没有发生冻结，先后复苏。可见印度谷螟应属于不耐结冰或对结冰敏感的昆虫。

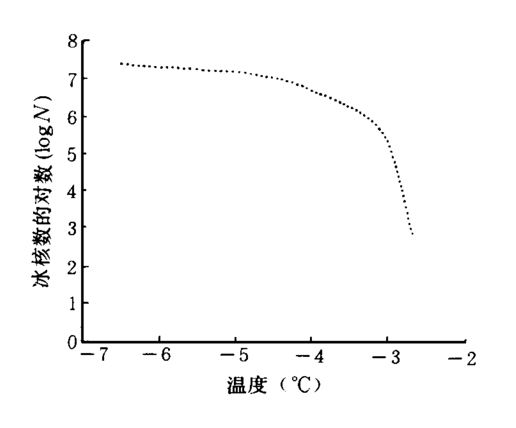


图1 细菌冰核的冰核谱

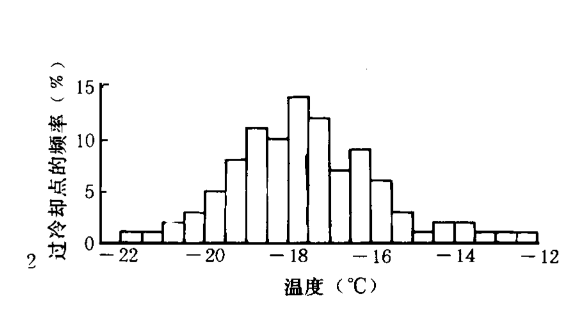


图2 印度谷螟幼虫过冷却点的频率分

2.2 过冷却点

按照上述试验方法，测定对照组幼虫的过冷却点。在已定的降温速率下，使虫体温度逐渐下降，直到体内开始结冰。这样就可以测定出每一头幼虫的过冷却点。共进行七次控制试验，测定 100 头幼虫，取得 100 个过冷却点的值。总体平均值为 －17.6 ℃，表明幼虫的抗寒力是相当强的。最高值为 －12.2 ℃，最低值为 －21.9 ℃，最大变化范围达 9.7 ℃，可见个体之间抗寒力的差异比较大。以 0.5 ℃ 为间隔，统计各温度区间开始冻结的频率，结果如图 2。

2.3 细菌冰核的作用

按照同样的方法，测定处理组幼虫的过冷却点。先在面粉中混入细菌冰核，分为 0.1g/kg 和 1g/kg，分别放入 100 头幼虫，置于昼温 18 ℃ 夜温 14 ℃ 下，24 h 后，用上述方法，逐头测定其过冷却点，同样取得两组各 100 个过冷却点的值。1g /kg 的总体平均值为 －4.0 ℃，抗寒力相当弱。其中最高值为 －2.0 ℃，最低值为 －8.0 ℃ 。0.1g/kg 的平均值为 －4.8 ℃，最高为 －2.0 ℃，最低为 －11.3 ℃ 。各温度区间开始冻结的频率如图 3。

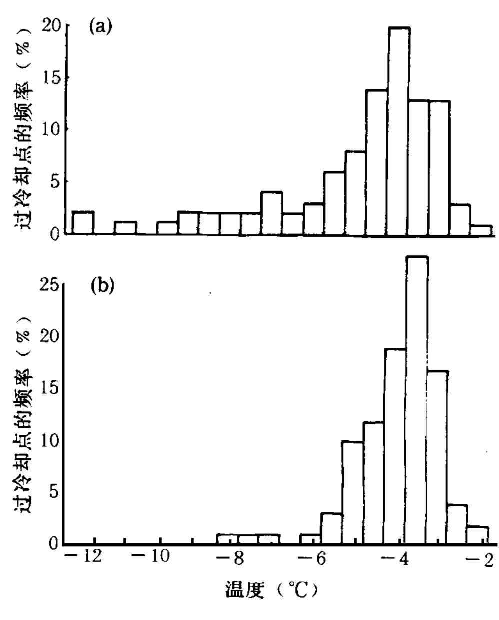


图 3　细菌冰核处理的印度谷螟幼虫过冷却点的频率分布
(a) 0.1 g/kg, (b) 1 g/kg

3　讨　论

3.1　印度谷螟有相当强的保持过冷却的能力。但是当它与细菌冰核接触后，过冷却点会大大提高。本试验结果，1g/kg 和 0.1g/kg 的平均过冷却点分别提高了 13.6 ℃ 和 12.8 ℃ 。因为它是不耐结冰的昆虫，所以提高过冷却点也就是降低了抗寒力。因此我们的试验结果也支持 Lee (1993)[2] 的观点：虽然现在世界上只有几个试验室在进行这方面的研究，但是可以预料细菌冰核有可能成为一种在冬季使用的、杀灭不耐结冰害虫的生物制剂，在控制越冬害虫方面起重要作用。

3.2　本试验测得的对照组的平均过冷却点，比Lee (1922)测得的[9] 要低约 7 ℃，这是因为前者用经过低温适应的幼虫，后者用未经低温适应的。可见低温适应能大大降低过冷却点。经 0.1g/kg 细菌冰核处理后，过冷却点都大大提高，前者提高的数值比后者要大 8 ℃；前者的平均过冷却点比后者高 0.6 ℃ 。这一结果表明，细菌冰核提高过冷却点的作用，不会因为害虫经过低温适应而减弱。

3.3 对照的过冷却点频率随温度的变化接近正态分布(图2),这与 Rothery 和 Block (1992)[12] 用 10 月的螨做的结果相似。细菌冰核处理后的过冷却点的频率分布发生了明显变化：不但显著提高了过冷却点，过冷却点的变化范围变窄，而且变成对数正态分布，众位数明显向高温一侧偏移。这种分布表明，在达到众位数之前，同样降低单位温度值时虫体累积冻结率的增加更快，如图 4，结果使害虫冻死 50% 对应的温度分别为 －4.3 ℃

(0.1g/kg)和 −3.7℃(1g/kg)，比总体平均温度还高。这个特点在评价细菌冰核的作用时应该加以考虑。

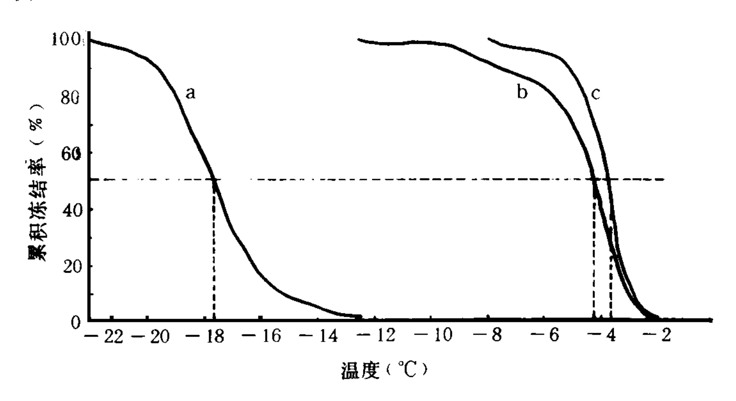


图4 印度谷螟幼虫的累积冻结率

(a) 对照 (b) 0.1g/kg 细菌冰核处理 (c) 1g/kg 冰核细菌处理

3.4 尽管试验表明细菌冰核有很强的促冻杀虫能力，但要发展成一种实用技术还需要进行很多研究。譬如越冬仓储害虫种类繁多，首先需要进行鉴定，确定适用的害虫种类。其次，现在已经能制备冰核活性很强的细菌冰核，每克干粉中含有10^{12}个冰核，比本试验用的高10^5倍。从理论上计算，用量降到本试验10万分之一，仍能取得同样的效果。但是要使这样微量的冰核制剂接触到虫体上去，还要解决许多技术问题。这种生物冰核的活性很容易被高温破坏，低温达不到一定强度时也不能起作用，所以要研究适用的地区和使用时期等。

参 考 文 献

1 Lee R E, Denlinger (Eds) D L. Insects at low temperature. New York and London: Chapman and Hall, 1991, 17 ~ 41

2 Lee R E, Lee M R, Strong−Gunderson J M. Insect cold-hardiness and ice nucleating active microorganisms including their potential use for biological control. J. Insect physiol., 1993, **39**(1): 1 ~ 12

3 Cannon R J C, Block W. Cold tolerance of microarthropods. Biol. Rev., 1988, **63**: 23 ~ 77.

4 Lindow S E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. A Bev. Phytopath., 1983, **21**: 363 ~ 384

5 孙福在，朱 红，何礼远等. 我国冰核活性细菌种类及其分布的初步研究. 中国农业科学，1989，**22**(2): 93 ~ 94

6 Feng Yuxiang, Juro Hanyu *et al*. Influences of ice nucleating active bacteria on the frost injury of crops. J. Agr. Met., 1989, **45**(1): 7 ~ 12

7 何维勋，冯玉香，孙福在等. 防御霜灾新途径的研究. 灾害学，1990，**1**(1): 14 ~ 19

8 Stroug−Gunderson, J M, Lee R E, Lee M R. Ingestion of ice nucleating active bacteria increases the supercooling point of the lady beelle *Hippodamia convergens*. J. Insect physiol., 1990, **36**: 153 ~ 157

9 Lee R E, Strong−Gunderson J M, Lee M R *et al*. Icenucleating active bacteria decrease the cold-hardiness of stored grain insects. J. Econ. Ent., 1992, **85**: 371 ~ 373

10 Strong-Gunderson J M, Lee R E, Lee M R. Topical application of ice nucleating bacteria decreases insect cold tolerance. Appl. Envir. Microbiol., 1992, **58**: 2711 ~ 2716
11 Vali G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. J. Atm. Sci., **28**: 402 ~ 409
12 Rothery P, Block W. Characterizing supercooling point distributions. Cryo-Letter, 1992, **13**: 193 ~ 198

STUDIES ON ELEVATING THE SUPERCOOLING POINT OF INDIAN MEAL MOTH LARVAE WITH BACTERIAL ICE NUCLEATORS

Feng Yuxiang　　He Weixun

(*Institute of Agrometeorology, Chinese Academy of Agricultural Sciences　Beijing*　100081)

Abstract　Indian meal moth Plodia interpunctella larvae are freeze-susceptible. In winter, they avoid freezing by lowering supercooling point. It is wellknown that ice nucleating active bacteria can significantly elevate the supercooling point of plants, resulting in promoting frost injury. Our study also proved that bacterial ice nucleators can significantly elevate the supercooling point of Indian meal moth larvae. In the control group, the mean supercooling point is −17.6 ℃. After treatment with 0.1g and 1g of bacterial ice nucleators mixed to 1kg of flour, the mean supercooling point elevate 12.8 ℃ and 13.6 ℃ above the control respectively. Results of this study support the idea that bacterial ice nucleators may be used for the control of freeze-susceptible insect pests in the winter.

Key words　bacterial ice nucleators; supercooling point